

PROCÉDÉ DE CREATION IN VITRO DE SEQUENCES  
POLYNUCLEOTIDIQUES RECOMBINEES PAR LIGATION ORIENTEE

5 La présente invention se rapporte à une méthode d'obtention *in vitro* de séquences polynucléotidiques recombinées par ligation orientée. L'invention vise tout particulièrement à générer puis sélectionner des séquences polynucléotidiques susceptibles de présenter une ou 10 plusieurs propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence et donc capables de conférer un phénotype amélioré et/ou de produire des protéines améliorées.

On entend par séquence de référence une séquence ayant des propriétés proches de celles recherchées.

On entend par *in vitro* tout événement, réaction ou procédé qui n'a pas lieu dans un organisme vivant.

On entend par ligation un procédé qui permet de créer une liaison phosphodiester entre deux fragments d'acides nucléiques.

25 On entend par ligation orientée tout procédé de ligation qui permet d'assembler dans un ordre déterminé des molécules d'acides nucléiques, notamment par hybridation desdites molécules d'acides nucléiques sur au moins une matrice nucléotidique.

On entend par séquence polynucléotidique toute molécule d'acide nucléique simple ou double brin.

30 Différentes techniques ont été développées pour favoriser la recombinaison *in vitro* entre différentes séquences polynucléotidiques, parmi celles-ci on peut citer plus particulièrement le DNA-Shuffling et le StEP toutes deux fondées sur l'utilisation de la PCR.

35 Le DNA-Shuffling comporte deux étapes, la fragmentation aléatoire par la DNase I de séquences polynucléotidiques, et une amplification par PCR dans laquelle les fragments précédemment générés servent d'amorces. A chaque étape d'hybridation, le changement de

matrice provoque des recombinaisons au niveau des régions ayant des séquences homologues. Le StEP consiste à mélanger différentes séquences polynucléotidiques contenant diverses mutations en présence d'une paire d'amorces. Ce mélange est soumis à une réaction de type PCR dans laquelle les étapes d'hybridation et de polymérisation sont regroupées en une seule étape de très courte durée. Ces conditions permettent l'hybridation des amorces mais diminuent la vitesse de polymérisation, de façon à ce que les fragments qui sont partiellement synthétisés s'hybrident aléatoirement sur les séquences polynucléotidiques portant les différentes mutations, permettant ainsi la recombinaison. Dans chacune de ces deux méthodes, l'étape de polymérisation est indispensable au processus de recombinaison. Ainsi, en fonction des polymérases choisies, cette étape de polymérisation peut être génératrice de mutations supplémentaires non souhaitées. En outre, à partir d'un certain nombre de cycles, le DNA-Shuffling et le StEP reposent sur le principe de l'hybridation d'une "méga-amorce" sur une matrice, ce qui entraîne probablement des difficultés de mise en oeuvre pour des séquences polynucléotidiques dont la taille est supérieure à 1,5 Kpb. Enfin, ces deux techniques ne permettent pas de contrôler le taux de recombinaisons, puisque celles-ci se font aléatoirement au cours des étapes successives de polymérisation.

La présente invention vise précisément à palier les inconvenients ci-dessus en offrant une méthode simple de préparation d'au moins une séquence polynucléotidique recombinée, en utilisant un procédé de ligation orientée de fragments obtenus à partir d'une banque de séquences polynucléotidiques.

On entend par banque de séquences polynucléotidiques un ensemble de séquences polynucléotidiques contenant au moins deux séquences polynucléotidiques hétérologues.

Dans une forme de mise en œuvre de l'invention, ce but est atteint grâce à un procédé comprenant les étapes suivantes :

5 a) la fragmentation d'une banque de séquences polynucléotidiques ,

b) la dénaturation des fragments ainsi obtenus,

c) l'hybridation de fragments obtenus à l'étape (b) avec une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage,

10 d) la ligation orientée desdits fragments pour obtenir au moins une séquence polynucléotidique recombinée,

Lorsque la matrice d'assemblage est double brin, elle est préalablement dénaturée avant l'étape (c) comme par exemple au cours de l'étape (b).

Le procédé de l'invention permet de recombiner de manière aléatoire différents fragments au cours des étapes (b), (c) et (d) au sein d'une séquence polynucléotidique. Ce procédé reproduit donc *in vitro* les phénomènes de recombinaison qui peuvent se produire *in vivo* en les favorisant. Le procédé de l'invention est donc tout particulièrement intéressant pour recombiner des séquences polynucléotidiqubes entre elles afin de générer de nouvelles séquences polynucléotidiqubes.

25 Ces séquences polynucléotidiqubes recombinées sont susceptibles de présenter des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence et donc capables de conférer un phénotype amélioré et/ou de produire des protéines améliorées.

30 Ce but est atteint grâce à un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la fragmentation d'une banque de séquences polynucléotidiqubes ,

b) la dénaturation des fragments,

35 c) l'hybridation de fragments obtenus à l'étape (b) avec une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage,

d) la ligation orientée desdits fragments pour obtenir au moins une séquence polynucléotidique recombinée,

e) la sélection des séquences polynucléotidiques recombinées présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes à une ou plusieurs séquences de référence.

5

La ou les matrice(s) d'assemblage peuvent-être simple ou double brin. Dans le cas où l'une de ces matrices est double brin, elle est préalablement dénaturée pour être ajoutée sous forme simple brin à l'étape (c) comme par exemple au cours de l'étape (b).

10

Le procédé de l'invention peut comprendre à l'issue de l'étape (e) la répétition des étapes (a), (b), (c) et (d). Dans ce cas, la banque de séquences polynucléotidiques contient au moins une séquence polynucléotidique recombinée qui a été sélectionnée en (e).

Le procédé de l'invention peut aussi comprendre à l'issue de l'étape (d) et avant l'étape (e), la répétition des étapes (b), (c) et (d), ou des étapes (a), (b), (c) et (d).

25

Ce dernier mode de réalisation est particulièrement utile dans le cas où à l'issue de l'étape (d) tous les fragments ne sont pas liqués. Dans ce cas, le procédé de l'invention comprend en outre, à la fin de l'étape (d) et avant l'étape (e), un ou plusieurs cycles des réactions suivantes:

30

- dénaturation des fragments liqués et non liqués issus de l'étape (d), éventuellement en présence d'une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage,

- hybridation desdits fragments avec une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage si celle(s)-ci n'est (ne sont) pas présente(s) lors de la dénaturation,

35

- ligation desdits fragments.

Ces réactions de dénaturation, hybridation et ligation, sont équivalentes aux étapes (b), (c) et (d), mais réalisées non pas avec les fragments de l'étape (a)

mais avec les fragments ligués et non ligués issus de l'étape (d).

5 Selon une forme de mise en œuvre particulière du procédé, les séquences polynucléotidiques de la banque sont simple brin. L'usage de fragments d'ADN simple brin est particulièrement adapté à la recombinaison de familles de gènes pour lesquelles une matrice simple brin donnée ou un mélange de matrices simple brin différentes seront  
10 hybridées à des fragments simple brin issus d'une banque de gènes homologues. Puisqu'il n'y a pas de séquences strictement complémentaires entre elles parmi la population de fragments, l'hybridation ne sera pas biaisée vers les séquences sauvages entre les fragments ou entre fragments et matrices. La température d'hybridation peut alors être  
15 ajustée en fonction du degré d'homologie entre les séquences, générant ainsi des molécules recombinées avec le degré de recombinaison le plus élevé possible. Des banques de molécules recombinées sont ainsi créées, avec une meilleure valeur en terme de diversité, augmentant considérablement les chances de trouver le bon mutant à  
20 l'issue du minimum de cycles de recombinaison.

Pour obtenir des molécules simple brin d'ADN,  
25 un phagémide de type Bluescript ou un vecteur de la famille des phages filamenteux comme M13mp18 peuvent être utilisés. Une autre façon de procéder consiste à générer des molécules double brin par PCR en utilisant une amorce phosphorylée en 5' et l'autre non phosphorylée. La digestion par l'exonucléase du phage lambda détruira les  
30 brins d'ADN phosphorylés en 5', laissant les brins non phosphorylés intacts. Une autre méthode de génération de molécules simple brin consiste à faire une amplification par PCR assymétrique à partir d'une matrice d'ADN méthylée.

La digestion par *Dpn* I détruira les brins méthylés, laissant intacts les produits de l'amplification qui pourront alors être purifiés après dénaturation.

5 Le procédé de l'invention peut comprendre en  
outre, une ou plusieurs des étapes suivantes :

- la séparation des séquences polynucléotidiques recombinées de la ou des matrice(s) d'assemblage avant l'étape (e).

- l'amplification des séquences polynucléotidiques recombinées avant l'étape (e).

- le clonage de séquences polynucléotidiques recombinées éventuellement après séparation des brins recombinés de la ou des matrices

Dans une forme de mise en œuvre avantageuse de la méthode, les extrémités des fragments générés à l'étape (a) sont telles qu'il peut y avoir hybridation adjacente de ces extrémités au moins à une matrice d'assemblage à l'étape (c) et ligation de ces fragments les uns avec les autres à l'étape (d). Les séquences polynucléotidiques de la banque sur laquelle le procédé de l'invention est effectué doivent être telles que les fragments obtenus au cours du procédé présentent des extrémités telles que décrites ci-dessus. Ces fragments peuvent être notamment obtenus au cours de l'étape (a), ou au cours de l'étape (d) par ligation de fragments.

Une forme de mise en oeuvre avantageuse du procédé de l'invention consiste à réaliser simultanément les étapes (c) et (d) selon une réaction dite de RLR pour l'expression anglaise de "Recombinant Ligation Reaction".

Outre les avantages indiqués précédemment, le procédé de l'invention est remarquable en ce qu'il favorise et accélère la recombinaison aléatoire *in vitro* de séquences polynucléotidiques, ces séquences polynucléotidiques pouvant être des gènes. On entend par gène un fragment ou une séquence d'ADN associée à une fonction biologique. Un gène peut être obtenu de différentes façons, dont la synthèse chimique, la synthèse par polymérisation ou par extraction dudit gène à partir d'une source d'acides nucléiques.

La recombinaison *in vitro* des séquences polynucléotidiques de la banque initiale par le procédé de l'invention permet donc d'obtenir une nouvelle banque contenant des séquences ayant acquis une ou plusieurs caractéristiques des séquences de la banque précédente. Le procédé de l'invention constitue donc une technique d'évolution *in vitro*.

Le procédé de l'invention constitue une alternative à la PCR recombinatoire telle que mise en oeuvre dans les techniques de DNA shuffling ou de StEP, puisqu'il ne nécessite pas d'étape de polymérisation *in vitro* pour aboutir à la recombinaison. Au contraire, l'étape clef du procédé de l'invention est l'étape (d) de ligation sur une matrice d'assemblage (ou ligation orientée), ce qui assure un très haut degré de fidélité au cours des événements de recombinaison.

Le procédé de l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'augmenter considérablement l'efficacité du réassemblage des fragments à liguer en utilisant la ligation orientée. En effet, dans le cas d'une séquence

découpée en n fragments, il existe de très nombreuses possibilités de réassociation des fragments en utilisant un procédé de ligation classique (sans utilisation d'une matrice de réassemblage qui oriente la ligation), parmi lesquelles une seule forme est intéressante. Dans le cas du procédé de l'invention, la ligation est orientée par la matrice d'assemblage, ce qui permet d'obtenir directement la seule forme intéressante.

La fragmentation de ces séquences polynucléotidiques à l'étape (a) peut se faire soit de manière contrôlée, soit de manière aléatoire.

Dans le cas d'une fragmentation réalisée de manière contrôlée, la fragmentation permet de maîtriser avec précision le degré de recombinaison voulu et la position des points de recombinaison. Selon une forme de réalisation préférée du procédé de l'invention, l'étape (a) consiste à soumettre les séquences polynucléotidiques de la banque à une hydrolyse par l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction. Ainsi, dans une forme de mise en œuvre particulière du procédé de l'invention, le degré de recombinaison et la position des points de recombinaison des séquences polynucléotidiques recombinées sont déterminés par la fragmentation de l'étape (a).

Ainsi, plus le nombre de fragments générés par séquence est grand, plus le nombre de fragments nécessaires pour recomposer une séquence est élevé, ce qui entraîne un taux de recombinaison élevé. En outre, la nature et la position des extrémités des fragments générés dans ce mode de réalisation du procédé de l'invention peuvent être connues et contrôlées, ce qui permet :

- de contrôler avec précision les zones où la recombinaison a lieu, ou

- d'induire la recombinaison entre des séquences polynucléotidiques, par exemple des gènes, si les extrémités des fragments sont créées dans des zones d'homologie entre ces séquences, ou des zones d'homologies entre ces séquences et la ou les matrices d'assemblage.

Dans le cas d'une fragmentation aléatoire, tout moyen enzymatique ou mécanique connu de l'homme de métier capable de couper aléatoirement l'ADN pourra être utilisé, comme par exemple une digestion par la Dnase I ou une sonication.

Le procédé de l'invention permettant d'augmenter considérablement l'efficacité de réassemblage des fragments à liguer, il peut donc être appliqué à l'orientation de la ligation multi-moléculaire à bouts francs. Dans cette application, on utilise comme matrice d'assemblage aux étapes (b) ou (c) des oligonucléotides simple ou double brin juste complémentaires de l'extrémité 3' d'un fragment et 5' du fragment adjacent, ce qui permet l'hybridation adjacente de ces deux extrémités sur la même matrice après l'étape de dénaturation. Une fois hybridées, les extrémités des fragments peuvent être ligées entre-elles de façon à orienter le sens de ligation des fragments à bout francs. La même approche peut être envisagée pour l'orientation de la ligation de fragments à bouts cohésifs.

Une mise en œuvre toute préférée du procédé de l'invention consiste à ajouter des enzymes capables, à l'étape (c) et/ou à l'étape (d), de reconnaître et de

5

dégrader et/ou couper de manière spécifique les extrémités non hybridées de fragments, lorsque celles-ci recouvrent d'autres fragments hybridés sur la même matrice. Un exemple préféré de ce type d'enzyme est l'enzyme Flap endonucléase .

10

Une mise en œuvre particulière du procédé de l'invention consiste donc à utiliser des enzymes du type Flap endonucléases lorsque les fragments générés à l'étape (a) peuvent se recouvrir lors de l'hybridation sur la matrice d'assemblage à l'étape (c ).

Ainsi, lors de l'hybridation de fragments d'ADN sur une matrice, ces enzymes ont pour propriété de reconnaître et de couper de manière spécifique les extrémités non hybridées de ces fragments, lorsque celles-ci recouvrent d'autres fragments hybridés sur la même matrice.

25

Lorsque les fragments utilisés au cours du procédé de l'invention sont double brin, une forme particulière de l'invention consiste à utiliser des enzymes de type exonucléase spécifiques du simple brin. Ces enzymes auront pour propriété de reconnaître et de dégrader de manière spécifique les extrémités simple brin non hybridées de ces fragments, lorsque celles-ci recouvrent d'autres fragments hybridés sur la même matrice.

30

Au cours de l'étape (c) d'hybridation, l'utilisation de ce type d'enzymes (notamment Flap, ou exonucléase spécifique du simple brin) permet donc d'augmenter le nombre d'extrémités adjacentes pouvant être liquées à l'étape (d), ce qui est particulièrement

important dans le cas de fragments obtenus par coupure aléatoire, car ces fragments présentent des zones de recouvrement les uns avec les autres lorsqu'ils s'hybrident sur la matrice d'assemblage.

5 Dans une mise en œuvre particulière du procédé de l'invention utilisant une ligase active à haute température et préférentiellement thermostable à l'étape (d), les enzymes capables de reconnaître et/ou de couper de manière spécifique les extrémités non hybridées des  
10 fragments, ajoutées à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) auront les mêmes propriétés de thermorésistance et d'activité à haute température que ladite ligase.

La banque de séquences polynucléotidiques sur laquelle est effectuée le procédé de l'invention peut être générée par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple à partir d'un gène sauvage par étapes de mutagénèse dirigée successives, par PCR "error prone" (2), par mutagénèse aléatoire chimique, par mutagénèse aléatoire *in vivo*, ou en combinant des gènes de familles proches ou distinctes au sein de la même espèce ou d'espèces différentes de façon à disposer d'une variété de séquences polynucléotidiques dans ladite banque.  
20

Parmi ces techniques, l'invention envisage plus particulièrement, un procédé dans lequel la banque de séquences polynucléotidiques est obtenue par une réaction de polymérisation en chaîne réalisée dans des conditions qui permettent de créer des mutations ponctuelles aléatoires.  
25

30

La banque initiale de séquences polynucléotidiques peut être constituée de séquences

synthétiques qui seront fragmentées à l'étape (a) ou qui peuvent constituer les fragments de l'étape (a).

5 Selon une forme de réalisation préférée du procédé de l'invention, l'étape (a) consiste à soumettre les séquences polynucléotidiques de la banque à une hydrolyse par l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction.

10 Pour accroître le degré de recombinaison générée par le procédé de l'invention, il suffit d'augmenter le nombre de fragments de restriction en utilisant des enzymes de restriction ayant un grand nombre de sites de coupure sur les séquences polynucléotidiques de la banque, ou en combinant plusieurs enzymes de restriction. Dans le cas de 15 l'utilisation d'une ligase thermostable et thermoactive, la taille du plus petit fragment ainsi généré sera avantageusement supérieure ou égale à 40 b ou 40 pb, afin de conserver une température d'hybridation compatible avec celle de l'étape (d) de ligation qui est généralement de l'ordre de 65 °C.

20 L'étape (a) peut encore être réalisée en générant une banque de fragments par traitement aléatoire enzymatique ou mécanique. En particulier, l'étape (a) peut consister en un traitement aléatoire avec la DNase I d'une 25 banque de séquences polynucléotidiques . Dans le cas où l'on utilise à l'étape (a) une fragmentation enzymatique ou mécanique aléatoire, cette forme de mise en oeuvre du procédé de l'invention a la particularité de permettre l'utilisation des fragments générés par ce traitement 30 comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction de RLR des étapes (c) et (d) simultanées.

5           L'étape (b) peut être réalisée en combinant au moins deux banques de fragments distinctes générées séparément à l'étape (a) à partir de la même banque initiale par des traitements différents, comme par exemple avec des enzymes de restriction différentes. Dans le cas de la mise en oeuvre de telles banques, on utilise les fragments obtenus à l'étape (a) comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction de RLR des étapes (c) et (d) simultanées.

10            D  
15            D  
20            D  
25            D  
30            D  
35            D  
40            D  
45            D  
50            D  
55            D  
60            D  
65            D  
70            D  
75            D  
80            D  
85            D  
90            D  
95            D

Les fragments de l'étape (a) du procédé de l'invention peuvent également être générés par des réactions d'amplification (telle que la PCR) menées sur les séquences polynucléotidiques de la banque. Deux solutions sont notamment envisageables. Dans un premier cas, les oligonucléotides amorces peuvent être conçus de manière à générer des fragments dont les extrémités sont adjacentes tout au long de la séquence d'assemblage. Dans un deuxième cas, les oligonucléotides amorces sont conçus de façon à générer des fragments ayant des séquences communes, ces fragments pouvant servir de matrice d'assemblage les uns pour les autres à l'étape (b) ou à l'étape (c).

25

30

L'efficacité de recombinaison du procédé de l'invention est fonction du nombre de fragments générés par séquence polynucléotidique à l'étape (a). En conséquence, le procédé de l'invention utilisera des séquences polynucléotidiques ayant été fragmentés en n fragments, n étant avantageusement supérieur ou égal à trois.

La matrice d'assemblage à l'étape (b) ou (c) est par exemple une séquence polynucléotidique issue de la banque initiale ou une séquence consensus de ladite banque, simple ou double brin. Dans le cas où la ou les matrices d'assemblage sont incorporées directement à l'étape (c) de l'invention, cette matrice doit être sous forme simple brin.

Selon une variante du procédé de l'invention, les matrices d'assemblage des étapes (b) ou (c) sont constituées d'oligonucléotides simples ou doubles brins.

Selon une forme particulière de mise en oeuvre du procédé de l'invention, des oligonucléotides, simple ou double brin, de longueur variable, sont ajoutés à l'étape (b) ou (c) en plus de la matrice. Ces oligonucléotides sont conçus pour pouvoir se substituer à une partie des fragments à l'étape (c), en effet, leur séquence est telle que :

- s'ils sont parfaitement homologues avec la séquence du fragment qu'ils remplacent, ils favorisent certaines combinaisons, ou

- s'ils sont partiellement hétérologues avec la séquence du fragment qu'ils remplacent, ils introduisent une ou des mutations dirigées supplémentaires.

On entend par séquences hétérologues, deux séquences dont la composition en bases diffère d'au moins une base.

Avant l'étape (e) du procédé de l'invention, il est possible de séparer les séquences polynucléotidiques recombinées de la matrice d'assemblage grâce à un marqueur présent sur la matrice d'assemblage ou sur les séquences polynucléotidiques recombinées. Il est en effet possible de

marquer chaque brin de la matrice selon des techniques connues de l'homme du métier. Par exemple, le marqueur de la matrice d'assemblage peut être un haptène et l'on sépare les séquences polynucléotidiques recombinées de la matrice d'assemblage par des techniques connues de l'homme du métier, comme par exemple un anticorps anti-haptène fixé sur un support ou une réaction biotine-streptavidine, si l'haptène est un marqueur biotine.

D'autres techniques peuvent être employées pour séparer les séquences polynucléotidiques recombinées de la matrice d'assemblage. La matrice d'assemblage peut aussi être préparée spécifiquement de façon à faciliter son élimination à la fin du procédé de l'invention. Elle peut ainsi être synthétisée par amplification PCR utilisant des dATP méthylés, ce qui permet sa dégradation par l'endonucléase de restriction *Dpn* I. Dans ce cas, les séquences polynucléotidiques recombinées ne doivent pas contenir de dATP méthylés. La matrice peut aussi avoir été préparée par amplification PCR en utilisant des dUTP, ce qui permet sa dégradation par traitement avec une uracyl-DNA-glycosylase. A l'inverse, il est possible de protéger les séquences polynucléotidiques recombinées en les amplifiant par PCR sélective avec des oligonucléotides portant des groupements phosphorothioates en 5'. Un traitement avec une exonucléase permet alors de dégrader spécifiquement la matrice d'assemblage.

Le procédé de l'invention peut comprendre avant le clonage éventuel de l'étape (e), une étape d'amplification des séquences polynucléotidiques recombinées. Toute technique d'amplification est acceptable notamment une amplification par PCR. Une des plus simple

F0510 F0510 F0510 F0510 F0510

20

25

30

consiste à réaliser une PCR qui permet d'amplifier spécifiquement les séquences polynucléotidiques recombinées grâce à des amorces qui ne peuvent s'hybrider que sur les extrémités des séquences recombinées. Les produits PCR sont ensuite clonés pour être caractérisés et les séquences polynucléotidiques présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence sont sélectionnées.

L'invention a pour objet de générer des séquences polynucléotidiques susceptibles de présenter des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence. Les séquences polynucléotides recombinées obtenues à l'étape (d) et éventuellement clonées sont ciblées par tout moyen approprié pour sélectionner les séquences polynucléotidiques recombinées ou les clones présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence. On entend, par exemple, par propriétés avantageuses la thermostabilité d'une enzyme ou sa qualité à pouvoir fonctionner dans des conditions de pH ou de température où de concentration saline plus adaptées à un procédé enzymatique, que les protéines témoins habituellement utilisées pour ledit procédé. A titre d'exemple d'un tel procédé, on peut citer un procédé industriel de désencollage des fibres textiles ou de blanchiment des pâtes à papier ou de la production d'arômes dans l'industrie laitière, les procédés de biocatalyse pour la synthèse par voie enzymatique de nouvelles molécules thérapeutiques, etc...

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la banque de séquence

polynucléotidique peut donc être le résultat d'un crible ayant permis de sélectionner par tout moyen approprié les séquences polynucléotidiques présentant des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins. Les 5 séquences ainsi sélectionnées constituent une banque restreinte.

Mais, il est aussi possible de partir d'une banque non restreinte afin de conserver la représentativité des propriétés contenues dans cette banque.

Les séquences codant pour la ou les protéines présentant une ou des propriétés avantageuses par rapport aux protéines de référence sont alors sélectionnées, par des criblages *in vivo* ou *in vitro*, et peuvent servir à constituer une nouvelle banque pour une éventuelle réitération du procédé de l'invention. Une mise en œuvre 10 avantageuse du procédé de l'invention consiste donc à utiliser comme banque plusieurs séquences polynucléotidiques sélectionnées après une première mise en œuvre du procédé de l'invention, éventuellement mélangées avec d'autres séquences polynucléotidiques. Parmi les 15 techniques de criblage qui peuvent être appliquées à chacun des clones de l'étape (e), les techniques de criblage par expression *in vitro* utilisant notamment la transcription *in vitro* des séquences polynucléotidiques recombinées puis la traduction *in vitro* des mRNAs obtenus, présentent 20 l'avantage de s'affranchir des problèmes de physiologie cellulaire, et de tous les inconvénients liés au clonage d'expression *in vivo*. En outre, ce type de criblage est facilement automatisable, ce qui permet de cibler un 25 nombre élevé de séquences polynucléotidiques recombinées.

DEPOSE  
PARIS  
15  
20

L'invention concerne aussi une séquence polynucléotidique recombinée obtenue par un procédé selon l'invention, ainsi qu'un vecteur contenant une telle séquence polynucléotidique recombinée, un hôte cellulaire transformé par une séquence polynucléotidique recombinée ou un vecteur de l'invention, ainsi qu'une protéine codée par cette séquence polynucléotidique recombinée. L'invention comprend également les banques correspondantes de séquences polynucléotidiques recombinées, de vecteurs, d'hôtes cellulaires ou de protéines.

Exemple :

Cet exemple a pour objectif de générer des séquences polynucléotidiques recombinées du gène de résistance à la kanamycine en utilisant la ligation orientée de fragments simples brin

Dans un premier temps, le gène de résistance à la kanamycine (1 Kb) de pACYC184 est cloné dans le polylinker de M13mp18 de telle façon que le phagémide simple brin contient le brin non codant du gène.

En parallèle, ce gène est amplifié par une PCR mutagène (error prone PCR) avec deux amorce qui sont complémentaires de la séquence du vecteur M13mp18 de par et d'autre de la séquence du gène. L'amorce pour le brin non codant est phosphorylée alors que l'amorce pour le brin codant ne l'est pas. Le produit de la PCR mutagène est digéré par l'exonucléase de lambda, ce qui génère une banque de brins codants de mutants du gène de la résistance à la kanamycine.

Cette banque de molécules simple brin est digérée par un mélange d'enzymes de restriction, à savoir Hae III, Hinf I et Taq I.

Cette banque de fragments simple brin ainsi obtenue est alors hybridée au phagémide simple brin et ligaturée avec une ligase thermostable. Cette étape est répétée plusieurs fois, jusqu'à ce que les fragments de petite taille ne puissent plus être observés lors d'un dépôt sur un gel d'agarose alors que la bande correspondant au simple brin du gène complet de la résistance à la kanamycine devienne un composant majeur du " smear " de molécules simple brin visibles sur le gel.

La bande correspondant à la taille du gène est alors découpée du gel et purifiée. Elle est ensuite hybridée avec deux oligonucléotides (40 mer) complémentaires des séquences de M13mp18 de chaque côté du gène, et ce duplex partiel est digéré par Eco RI et Sph I puis ligaturée dans un vecteur M13 mp18 digéré par les mêmes enzymes.

Les cellules transformées avec le produit de ligation sont ciblées pour une résistance accrue à la kanamycine.

Le clonage des molécules simple brin recombinées peut éventuellement être réalisé par une PCR avec deux amorces du gène de taille complète et clonage du produit double brin de cette amplification. Pour éviter les mutations indésirables, cette amplification sera réalisée avec la polymérase de type Pfu et par un nombre limité de cycles.

Les plasmides des clones significativement plus résistants à la kanamycine que la souche initiale sont purifiés et utilisés comme matrices pour une PCR à la polymérase Pfu, dans des conditions de haute fidélité, avec le couple d'amorces phosphorylé/non phosphorylé tel que défini précédemment. Ceci génère la seconde génération de fragments simple brin, après un traitement à l'exonucléase de lambda et la fragmentation avec les enzymes de restriction. Les enzymes utilisées à cette étape peuvent être composées d'un mélange différent (Bst NI, Taq I et Mnl I).

Les étapes de recombinaison et de sélection sont répétées plusieurs fois, jusqu'à ce qu'un accroissement substantiel de la résistance à la kanamycine soit obtenu.

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
2510  
2511  
2512  
2513  
2514  
2515  
2516  
2517  
2518  
2519  
2520  
2521  
2522  
2523  
2524  
2525  
2526  
2527  
2528  
2529  
2530  
2531  
2532  
2533  
2534  
2535  
2536  
2537  
2538  
2539  
2540  
2541  
2542  
2543  
2544  
2545  
2546  
2547  
2548  
2549  
2550  
2551  
2552  
2553  
2554  
2555  
2556  
2557  
2558  
2559  
2560  
2561  
2562  
2563  
2564  
2565  
2566  
2567  
2568  
2569  
2570  
2571  
2572  
2573  
2574  
2575  
2576  
2577  
2578  
2579  
2580  
2581  
2582  
2583  
2584  
2585  
2586  
2587  
2588  
2589  
2590  
2591  
2592  
2593  
2594  
2595  
2596  
2597  
2598  
2599  
25100  
25101  
25102  
25103  
25104  
25105  
25106  
25107  
25108  
25109  
25110  
25111  
25112  
25113  
25114  
25115  
25116  
25117  
25118  
25119  
25120  
25121  
25122  
25123  
25124  
25125  
25126  
25127  
25128  
25129  
25130  
25131  
25132  
25133  
25134  
25135  
25136  
25137  
25138  
25139  
25140  
25141  
25142  
25143  
25144  
25145  
25146  
25147  
25148  
25149  
25150  
25151  
25152  
25153  
25154  
25155  
25156  
25157  
25158  
25159  
25160  
25161  
25162  
25163  
25164  
25165  
25166  
25167  
25168  
25169  
25170  
25171  
25172  
25173  
25174  
25175  
25176  
25177  
25178  
25179  
25180  
25181  
25182  
25183  
25184  
25185  
25186  
25187  
25188  
25189  
25190  
25191  
25192  
25193  
25194  
25195  
25196  
25197  
25198  
25199  
25200  
25201  
25202  
25203  
25204  
25205  
25206  
25207  
25208  
25209  
25210  
25211  
25212  
25213  
25214  
25215  
25216  
25217  
25218  
25219  
25220  
25221  
25222  
25223  
25224  
25225  
25226  
25227  
25228  
25229  
25230  
25231  
25232  
25233  
25234  
25235  
25236  
25237  
25238  
25239  
25240  
25241  
25242  
25243  
25244  
25245  
25246  
25247  
25248  
25249  
25250  
25251  
25252  
25253  
25254  
25255  
25256  
25257  
25258  
25259  
25260  
25261  
25262  
25263  
25264  
25265  
25266  
25267  
25268  
25269  
25270  
25271  
25272  
25273  
25274  
25275  
25276  
25277  
25278  
25279  
25280  
25281  
25282  
25283  
25284  
25285  
25286  
25287  
25288  
25289  
25290  
25291  
25292  
25293  
25294  
25295  
25296  
25297  
25298  
25299  
25300  
25301  
25302  
25303  
25304  
25305  
25306  
25307  
25308  
25309  
25310  
25311  
25312  
25313  
25314  
25315  
25316  
25317  
25318  
25319  
25320  
25321  
25322  
25323  
25324  
25325  
25326  
25327  
25328  
25329  
25330  
25331  
25332  
25333  
25334  
25335  
25336  
25337  
25338  
25339  
25340  
25341  
25342  
25343  
25344  
25345  
25346  
25347  
25348  
25349  
25350  
25351  
25352  
25353  
25354  
25355  
25356  
25357  
25358  
25359  
25360  
25361  
25362  
25363  
25364  
25365  
25366  
25367  
25368  
25369  
25370  
25371  
25372  
25373  
25374  
25375  
25376  
25377  
25378  
25379  
25380  
25381  
25382  
25383  
25384  
25385  
25386  
25387  
25388  
25389  
25390  
25391  
25392  
25393  
25394  
25395  
25396  
25397  
25398  
25399  
25400  
25401  
25402  
25403  
25404  
25405  
25406  
25407  
25408  
25409  
25410  
25411  
25412  
25413  
25414  
25415  
25416  
25417  
25418  
25419  
25420  
25421  
25422  
25423  
25424  
25425  
25426  
25427  
25428  
25429  
25430  
25431  
25432  
25433  
25434  
25435  
25436  
25437  
25438  
25439  
25440  
25441  
25442  
25443  
25444  
25445  
25446  
25447  
25448  
25449  
25450  
25451  
25452  
25453  
25454  
25455  
25456  
25457  
25458  
25459  
25460  
25461  
25462  
25463  
25464  
25465  
25466  
25467  
25468  
25469  
25470  
25471  
25472  
25473  
25474  
25475  
25476  
25477  
25478  
25479  
25480  
25481  
25482  
25483  
25484  
25485  
25486  
25487  
25488  
25489  
25490  
25491  
25492  
25493  
25494  
25495  
25496  
25497  
25498  
25499  
25500  
25501  
25502  
25503  
25504  
25505  
25506  
25507  
25508  
25509  
25510  
25511  
25512  
25513  
25514  
25515  
25516  
25517  
25518  
25519  
25520  
25521  
25522  
25523  
25524  
25525  
25526  
25527  
25528  
25529  
25530  
25531  
25532  
25533  
25534  
25535  
25536  
25537  
25538  
25539  
25540  
25541  
25542  
25543  
25544  
25545  
25546  
25547  
25548  
25549  
25550  
25551  
25552  
25553  
25554  
25555  
25556  
25557  
25558  
25559  
25560  
25561  
25562  
25563  
25564  
25565  
25566  
25567  
25568  
25569  
25570  
25571  
25572  
25573  
25574  
25575  
25576  
25577  
25578  
25579  
25580  
25581  
25582  
25583  
25584  
25585  
25586  
25587  
25588  
25589  
25590  
25591  
25592  
25593  
25594  
25595  
25596  
25597  
25598  
25599  
25600  
25601  
25602  
25603  
25604  
25605  
25606  
25607  
25608  
25609  
25610  
25611  
25612  
25613  
25614  
25615  
25616  
25617  
25618  
25619  
25620  
25621  
25622  
25623  
25624  
25625  
25626  
25627  
25628  
25629  
25630  
25631  
25632  
25633  
25634  
25635  
25636  
25637  
25638  
25639  
25640  
25641  
25642  
25643  
25644  
25645  
25646  
25647  
25648  
25649  
25650  
25651  
25652  
25653  
25654  
25655  
25656  
25657  
25658  
25659  
25660  
25661  
25662  
25663  
25664  
25665  
25666  
25667  
25668  
25669  
25670  
25671  
25672  
25673  
25674  
25675  
25676  
25677  
25678  
25679  
25680  
25681  
25682  
25683  
25684  
25685  
25686  
25687  
25688  
25689  
25690  
25691  
25692  
25693  
25694  
25695  
25696  
25697  
25698  
25699  
25700  
25701  
25702  
25703  
25704  
25705  
25706  
25707  
25708  
25709  
25710  
25711  
25712  
25713  
25714  
25715  
25716  
25717  
25718  
25719  
25720  
25721  
25722  
25723  
25724  
25725  
25726  
25727  
25728  
25729  
25730  
25731  
25732  
25733  
25734  
25735  
25736  
25737  
25738  
25739  
25740  
25741  
25742  
25743  
25744  
25745  
25746  
25747  
25748  
25749  
25750  
25751  
25752  
25753  
25754  
25755  
25756  
25757  
25758  
25759  
25760  
25761  
25762  
25763  
25764  
25765  
25766  
25767  
25768  
25769  
25770  
25771  
25772  
25773  
25774  
25775  
25776  
25777  
25778  
25779  
25780  
25781  
25782  
25783  
25784  
25785  
25786  
25787  
25788  
25789  
25790  
25791  
25792  
25793  
25794  
25795  
25796  
25797  
25798  
25799  
25800  
25801  
25802  
25803  
25804  
25805  
25806  
25807  
25808  
25809  
25810  
25811  
25812  
25813  
25814  
25815  
25816  
25817  
25818  
25819  
25820  
25821  
25822  
25823  
25824  
25825  
25826  
25827  
25828  
25829  
25830  
25831  
25832  
25833  
25834  
25835  
25836  
25837  
25838  
25839  
25840  
25841  
25842  
25843  
25844  
25845  
25846  
25847  
25848  
25849  
25850  
25851  
25852  
25853  
25854  
25855  
25856  
25857  
25858  
25859  
25860  
25861  
25862  
25863  
25864  
25865  
25866  
25867  
25868  
25869  
25870  
25871  
25872  
25873  
25874  
25875  
25876  
25877  
25878  
25879  
25880  
25881  
25882  
25883  
25884  
25885  
25886  
25887  
25888  
25889  
25890  
25891  
25892  
25893  
25894  
25895  
25896  
25897  
25898  
25899  
25900  
25901  
25902  
25903  
25904  
25905  
25906  
25907  
25908  
25909  
25910  
25911  
25912  
25913  
25914  
25915  
25916  
25917  
25918  
25919  
25920  
25921  
25922  
25923  
25924  
25925  
25926  
25927  
25928  
25929  
25930  
25931  
25932  
25933  
25934  
25935  
25936  
25937  
25938  
25939  
25940  
25941  
25942  
25943  
25944  
25945  
25946  
25947  
25948  
25949  
25950  
25951  
25952  
25953  
25954  
25955  
25956  
25957  
25958  
25959  
25960  
25961  
25962  
25963  
25964  
25965  
25966  
25967  
25968  
25969  
25970  
25971  
25972  
25973  
25974  
25975  
25976  
25977  
25978  
25979  
25980  
25981  
25982  
25983  
25984  
25985  
25986  
25987  
25988  
25989  
25990  
25991  
25992  
25993  
25994  
25995  
25996  
25997  
25998  
25999  
25100  
25101  
25102  
25103  
25104  
25105  
25106  
25107  
25108  
25109  
25110  
25111  
25112  
25113  
25114  
25115  
25116  
25117  
25118  
25119  
25120  
25121  
25122  
25123  
25124  
25125  
25126  
25127  
25128  
25129  
25130  
25131  
25132  
25133  
25134  
25135  
25136  
25137  
25138  
25139  
25140  
25141  
25142  
25143  
25144  
25145  
25146  
25147  
25148  
25149  
25150  
25151  
25152  
25153  
25154  
25155  
25156  
25157  
25158  
25159  
25160  
25161  
25162  
25163  
25164  
25165  
25166  
25167  
25168  
25169  
25170  
25171  
25172  
25173  
25174  
25175  
25176  
25177  
25178  
25179  
25180  
25181  
25182  
25183  
25184  
25185  
25186  
25187  
25188  
25189  
25190  
25191  
25192  
25193  
25194  
25195  
25196  
25197  
25198  
25199  
25200  
25201  
25202  
25203  
25204  
25205  
25206  
25207  
25208  
25209  
25210  
25211  
25212  
25213  
25214  
25215  
25216  
25217  
25218  
25219  
25220  
25221  
25222  
25223  
25224  
25225  
25226  
25227  
25228  
25229  
25230  
25231  
25232  
25233  
25234  
25235  
25236  
25237  
25238  
25239  
25240  
25241  
25242  
25243  
25244  
25245  
25246  
25247  
25248  
25249  
25250  
25251  
25252  
25253  
25254  
25255  
25256  
25257  
25258  
25259  
25260  
25261  
25262  
25263  
25264  
25265  
25266  
25267  
25268  
25269  
25270  
25271  
25272  
25273  
25274  
25275  
25276  
25277  
25278  
25279  
25280  
25281  
25282  
25283  
25284  
25285  
25286  
25287  
25288  
25289  
25290  
25291  
25292  
25293  
25294  
25295  
25296  
25297  
25298  
25299  
25300  
25301  
25302  
25303  
25304  
25305  
25306  
25307  
25308  
25309  
25310  
25311  
25312  
25313  
25314  
25315  
25316  
25317  
25318  
25319  
25320  
25321  
25322  
25323  
25324  
25325  
25326  
25327  
25328  
25329  
25330  
25331  
25332  
25333  
25334  
25335  
25336  
25337  
25338  
25339  
25340  
25341  
25342  
25343  
25344  
25345  
25346  
25347  
25348  
25349  
25350  
25351  
25352  
25353  
25354  
25355  
25356  
25357  
25358  
25359  
25360  
25361  
25362  
25363  
25364  
25365  
25366  
25367  
25368  
25369  
25370  
25371  
25372  
25373  
25374  
25375  
25376  
25377  
25378  
25379  
25380  
25381  
25382  
25383  
25384  
25385  
25386  
25387  
25388  
25389  
25390  
25391  
25392  
25393  
25394  
25395  
25396  
25397  
25398  
25399  
25400  
25401  
25402  
25403  
25404  
25405  
25406  
25407  
25408  
25409  
25410  
25411  
25412  
25413  
25414  
25415  
25416  
25417  
25418  
25419  
25420  
25421  
25422  
25423  
25424  
25425  
25426  
25427  
25428  
25429  
25430  
25431  
25432  
25433  
25434  
25435  
25436  
25437  
25438  
25439  
25440  
25441  
25442  
25443  
25444  
25445  
25446  
25447  
25448  
25449  
25450  
25451  
25452  
25453  
25454  
25455  
25456  
25457  
25458  
25459  
25460  
25461  
25462  
25463  
25464  
25465  
25466  
25467  
25468  
25469  
25470  
25471  
25472  
25473  
25474  
25475  
25476  
25477  
25478  
25479  
25480  
25481  
25482  
25483  
25484  
25485  
25486  
25487  
25488  
25489  
25490  
25491  
25492  
25493  
25494  
25495  
25496  
25497  
25498  
25499  
25500  
25501  
25502  
25503  
25504  
25505  
25506  
25507  
25508  
25509  
25510  
25511  
25512  
25513  
25514  
25515  
25516  
25517  
25518  
25519  
25520  
25521  
25522  
25523  
25524  
25525  
25526  
25527  
25528  
25529  
25530  
25531  
25532  
25533  
25534  
25535  
25536  
25537  
25538  
25539  
25540  
25541  
25542  
25543  
25544  
25545  
25546  
25547  
25548  
25549  
25550  
25551  
25552  
25553  
25554  
25555  
25556  
25557  
25558  
25559  
25560  
25561  
25562  
25563  
25564  
25565  
25566  
25567  
25568  
25569  
25570  
25571  
25572  
25573  
25574  
25575  
25576  
25577  
25578  
25579  
25580  
25581  
25582  
25583  
25584  
25585  
25586  
25587  
25588  
25589  
25590  
25591  
25592  
25593  
25594  
25595  
25596  
25597  
25598  
25599  
25600  
25601  
25602  
25603  
25604  
25605  
25606  
25607  
25608  
25609  
25610  
25611  
25612  
25613  
25614  
25615  
25616  
25617  
25618  
25619  
25620  
25621  
25622  
25623  
25624  
25625  
25626  
25627  
25628  
25629  
25630  
25631  
25632  
25633  
25634  
25635  
25636  
25637  
25638  
25639  
25640  
25641  
25642  
25643  
25644  
25645  
25646  
25647  
25648  
25649  
25650  
25651  
25652  
25653  
25654  
25655  
25656  
25657  
25658  
25659  
25660  
25661  
25662  
25663  
25664  
25665  
25666  
25667  
25668  
25669  
25670  
25671  
25672  
25673  
25674  
25675  
25676  
25677  
25678  
25679  
25680  
25681  
25682<br

## REVENDICATIONS

5           1) Procédé de création d'au moins une séquence polynucléotidique recombinée caractérisé en ce qu'il comprend une étape de ligation orientée de fragments issus d'une banque d'au moins deux séquences polynucléotidiques.

10          2) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

      a) la fragmentation d'une banque de séquences polynucléotidiques ,

      b) la dénaturation des fragments ainsi obtenus,

      c) l'hybridation de fragments obtenus à l'étape

      (b) avec une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage,

      d) la ligation orientée desdits fragments pour obtenir au moins une séquence polynucléotidique recombinée,

20          3) Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend après l'étape (d) :

      e) la sélection des séquences polynucléotidiques recombinées présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes à une ou plusieurs séquences de référence.

25          4) Procédé selon la revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la banque de séquences polynucléotidiques contient des séquences polynucléotidiques double brin

30          5) Procédé selon la revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la banque de séquences

polynucléotidiques contient des séquences  
polynucléotidiques simple brin

6) Procédé selon la revendication 2 à 5  
5 caractérisé en ce que au moins une matrice d'assemblage est double brin et qu'elle est préalablement dénaturée pour être ajoutée sous forme simple brin à l'étape (c).

7) Procédé selon la revendication 2 à 5  
10 caractérisé en ce que au moins une matrice d'assemblage est simple brin

8) Procédé selon les revendications 2 à 7  
caractérisé en ce qu'il comprend à l'issue de l'étape (d)  
515 au moins une répétition des étapes (a), (b), (c) et (d).

9) Procédé selon les revendications 2 à 7  
caractérisé en ce qu'il comprend à l'issue de l'étape (d)  
au moins une répétition des étapes (b), (c) et (d).  
20

10) Procédé selon les revendications 3 à 7  
caractérisé en ce qu'il comprend à l'issue de l'étape (e)  
le choix d'au moins une séquence polynucléotidique  
recombinée pour effectuer au moins une répétition des  
étapes (a), (b), (c), (d) et (e).  
25

11) Procédé selon l'une des revendications 2 à  
10 , caractérisé en ce qu'il comprend la séparation des  
30 séquences polynucléotidiques recombinées de la ou des  
matrice(s) d'assemblage avant l'étape (e).

12) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend l'amplification des séquences polynucléotidiques recombinées avant l'étape (e).

5

13) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend avant l'étape (e), le clonage de séquences polynucléotidiques recombinées éventuellement après 10 séparation des brins recombinés de la ou des matrices.

0  
0  
0  
0  
0  
0  
0  
15  
0  
0  
0  
0  
0  
0  
0  
20

14) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce que les extrémités des fragments générés à l'étape (a) sont telles qu'il puisse y avoir hybridation adjacente de ces extrémités sur au moins une matrice d'assemblage à l'étape (c) et ligation de ces fragments les uns avec les autres à l'étape (d).

15) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce que les étapes (c) et (d) sont réalisées simultanément.

25 16) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15, caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à soumettre les séquences polynucléotidiques de la banque initiale à une hydrolyse par l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction.

30 17) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 caractérisé en ce que la fragmentation aléatoire des séquences polynucléotidiques à

l'étape (a) se fait par tout moyen enzymatique ou mécanique connu.

5           18) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13 et 15 à 17, caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) des enzymes capables de reconnaître et dégrader et/ou couper de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments, lorsque lesdites extrémités recouvrent d'autres  
10           fragments hybridés sur la même matrice.

15           19) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) l'enzyme Flap endonucléase.

20           20) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (c) et ou (d) au moins une exonucléase spécifique du simple brin capable de reconnaître et dégrader de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments, lorsque lesdites extrémités recouvrent d'autres fragments hybridés sur la même matrice.

25           21) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on utilise à l'étape (d) une ligase active à haute température et de préférence thermostable.

30           22) Procédé selon les revendications 18 et 19, caractérisé en ce que les endonucléases capables de reconnaître et de dégrader et/ou couper de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments

ajoutées à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) ont les mêmes propriétés de thermorésistance et d'activité à haute température que la ligase utilisée à l'étape (d).

5               23) Procédé selon la revendications 20,  
caractérisé en ce que les exonucléases capables de reconnaître et de dégrader de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments ajoutées à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) ont les mêmes propriétés de 10 thermorésistance et d'activité à haute température que la ligase utilisée à l'étape (d).

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

24) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la banque initiale de séquences polynucléotidiques est générée à partir d'un gène sauvage par étapes de mutagénèse dirigée successives, par PCR error prone, par mutagénèse aléatoire chimique, par mutagénèse aléatoire *in vivo*, ou en combinant des gènes de familles proches ou distinctes au sein de la même espèce ou d'espèces différentes de façon à disposer d'une variété de séquences polynucléotidiques dans la banque initiale.

25               25) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 23 , caractérisé en ce que la banque initiale de séquences polynucléotidiques est constituée de séquences synthétiques qui seront fragmentées à l'étape (a) ou qui peuvent constituer les fragments de l'étape (a)

30               26) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 16 et 18 à 25 caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à soumettre la banque initiale à une

hydrolyse par l'action d'enzymes de restriction ayant un grand nombre de sites de coupure sur les séquences polynucléotidiques de la banque initiale, ou en combinant plusieurs enzymes de restriction.

5

27) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 et 17 à 25 caractérisé en ce que l'étape (a) consiste en un traitement aléatoire avec la DNase I d'une banque initiale de séquences polynucléotidiques .

10

28) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 et 17 à 27 caractérisé en ce que l'on utilise des fragments générés par un traitement de façon aléatoire comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction des étapes (c) et (d) simultanées.

20

29) Procédé selon la revendication 2 à 16 et 18 à 26, caractérisé en ce que l'on utilise les fragments obtenus à l'étape (a) par un traitement avec des enzymes de restriction comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction de des étapes (c) et (d) simultanées.

25

30

30) Procédé selon la revendication 2 à 15 et 18 à 26, caractérisé en ce que les fragments de l'étape (a) sont obtenus par des réactions d'amplification menées sur les séquences polynucléotidiques de la banque initiale en utilisant des oligonucléotides amorces permettant de générer des fragments ayant des séquences communes, lesdits

fragments servant de matrice d'assemblage les uns pour les autres à l'étape (b) ou à l'étape (c).

5           31) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que à l'étape (a) la banque initiale est fragmentée en n fragments, n étant supérieur ou égal à trois.

10           32) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (b) ou (c) en plus de la matrice, des oligonucléotides, simple ou double brin, de longueur variable.

15           33) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, avant l'étape (e), on sépare les séquences polynucléotidiques recombinées de la matrice d'assemblage grâce à un marqueur présent sur la matrice d'assemblage ou sur les séquences polynucléotidiques recombinées.

20           34) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les séquences polynucléotidiques recombinées obtenues à l'étape (d) et éventuellement clonées sont ciblées par tout moyen approprié pour sélectionner les séquences polynucléotidiques recombinées ou les clones présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence.

35) Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le criblage se fait par expression *in vitro* des séquences polynucléotidiques recombinées

5 36) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la banque de séquences polynucléotidiques initiale est constituée par une ou plusieurs banques restreintes préparées par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 35, 10 éventuellement mélangées avec d'autres séquences polynucléotidiques.

15 37) Une séquence polynucléotidique recombinée présentant une ou plusieurs propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence, obtenue et sélectionnée par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 36, ladite séquence ayant une taille supérieure à 1,5 Kpb.

20 38) Un vecteur contenant une séquence polynucléotidique selon la revendication 37.

25 39) Un hôte cellulaire transformé par une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 37 ou par un vecteur selon la revendication 38.

30 40) Une protéine codée par une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 37.

41) Une banque constituée de séquences polynucléotidiques recombinées selon la revendication 37,

ou de vecteur selon la revendication 38, ou d'hôtes cellulaires selon la revendication 39, ou de protéines selon la revendication 40.

PROCÉDÉ DE CREATION IN VITRO DE SEQUENCES  
POLYNUCLEOTIDIQUES RECOMBINEES PAR LIGATION ORIENTÉE

La présente invention a pour objet un procédé de création d'au moins une séquence polynucléotidique recombinée comprenant une étape de ligation orientée de fragments issus d'une banque d'au moins deux séquences polynucléotidiq[ue]ues, et éventuellement le clonage des séquences polynucléotidiq[ue]ues recombinées, et la sélection des séquences polynucléotidiq[ue]ues présentant des propriétés avantageuses par rapport à une ou plusieurs séquences de référence.

TOSCHI - TÉLÉTYPE 60

TOS2200-TS2000B60

1/9

Figure 1 A

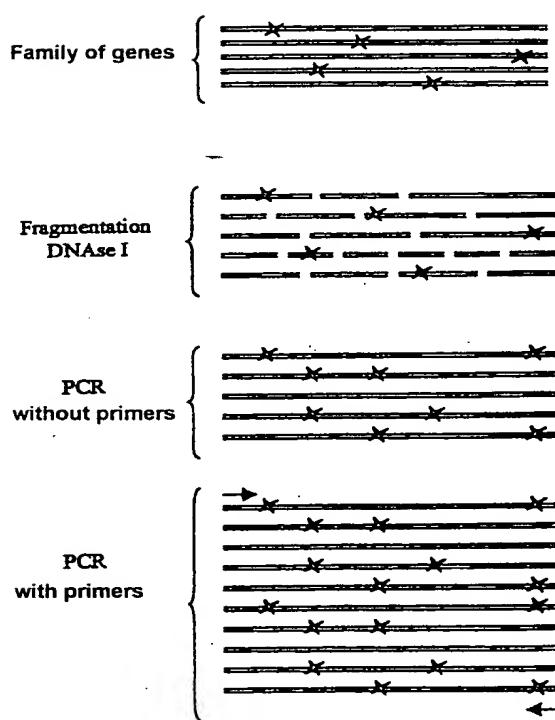


Figure 1 B  
(Double-stranded process carried out, but illustrated here with a single strand)

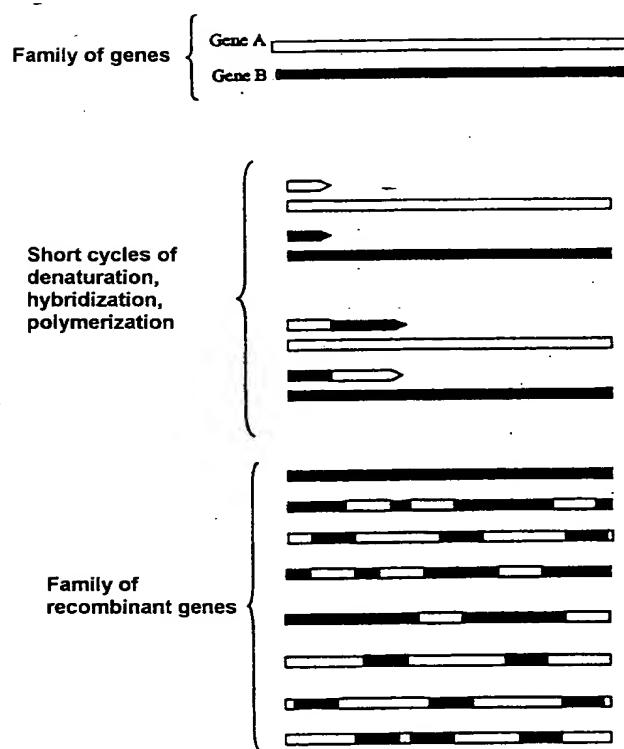


Fig. 2

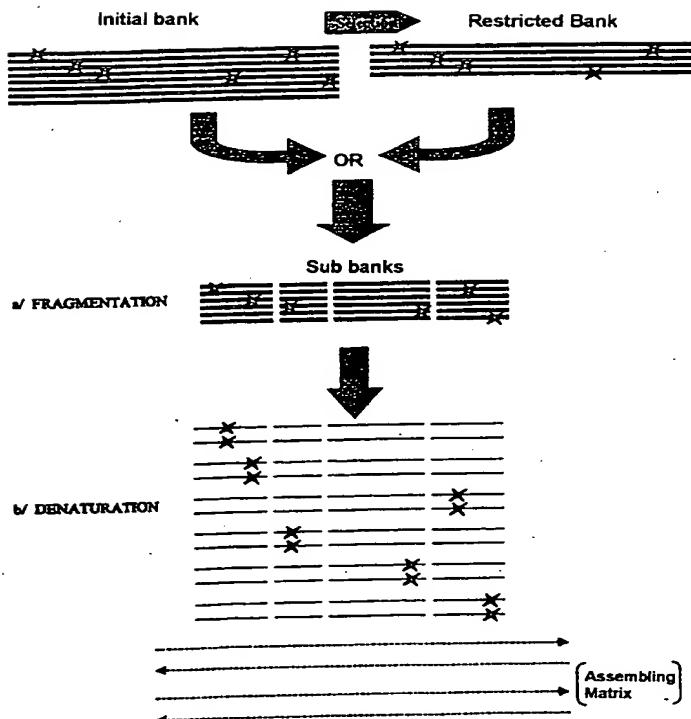


Fig. 2- continued

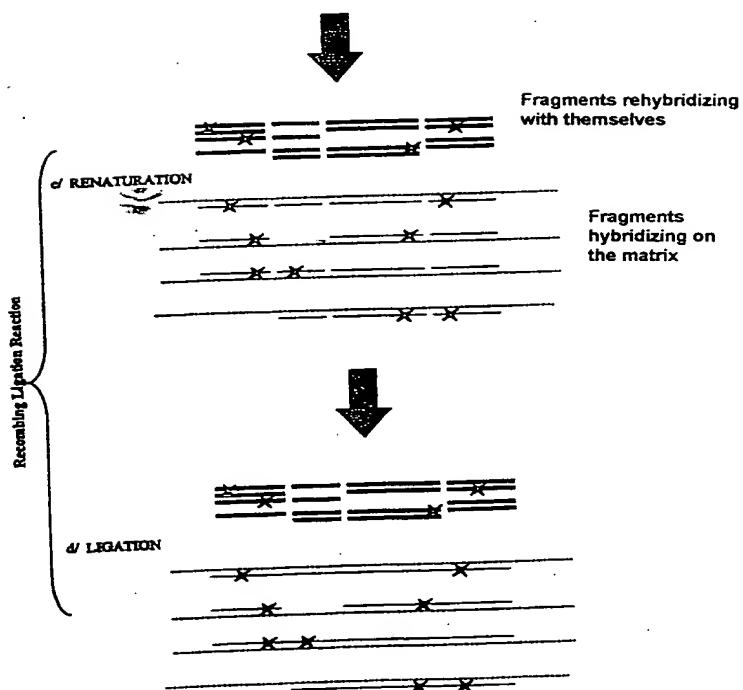
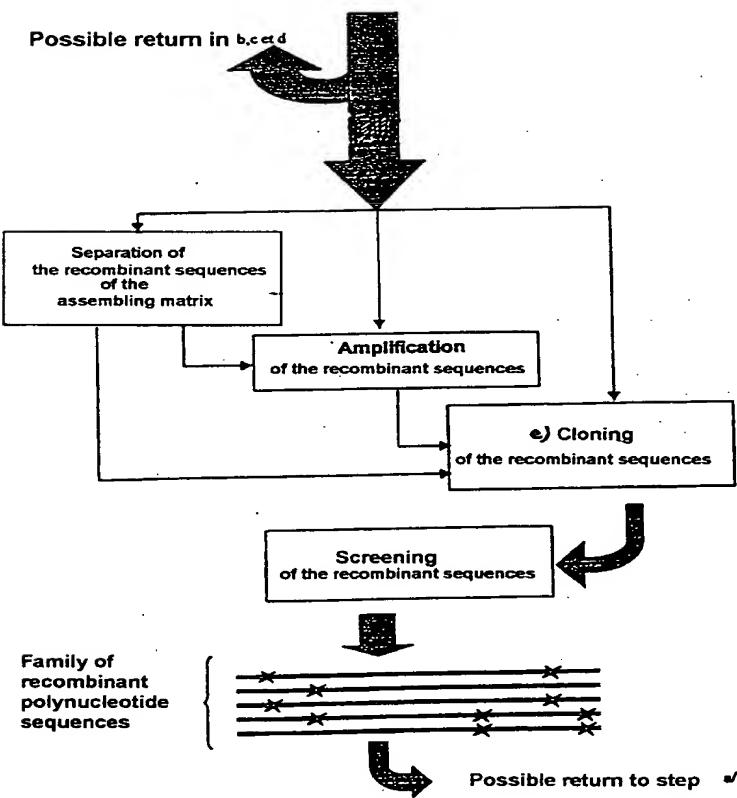


Fig. 2 continued

TOEPLITZ TEGORISIO



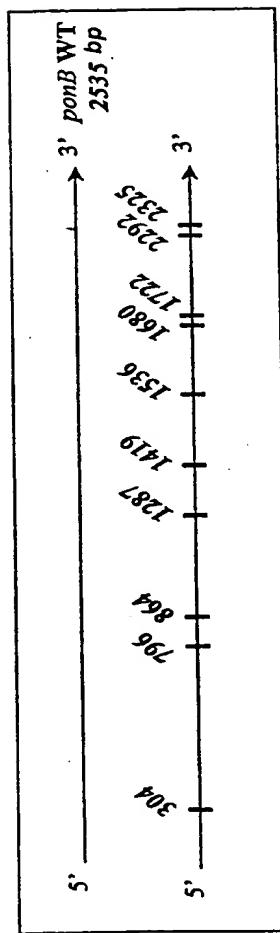


Figure 3: Position of the ten mutation zones (sites *Pvu* II and *Pst* I)

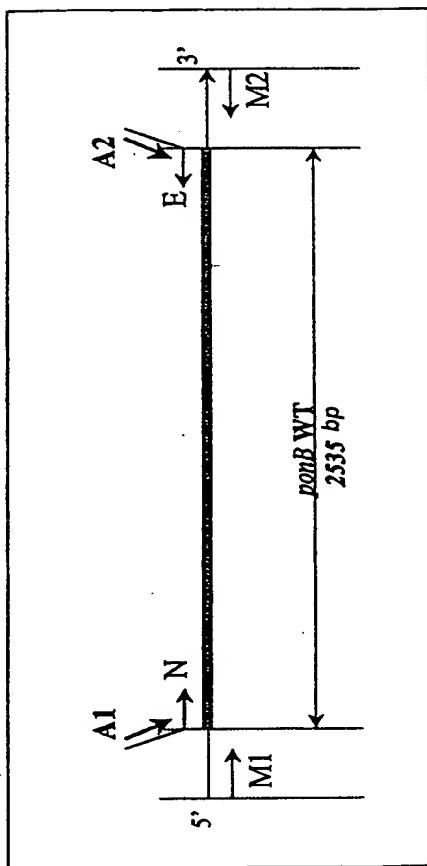


Figure 4: Position of the primers used as compared to the sequence of the *pnbB* gene

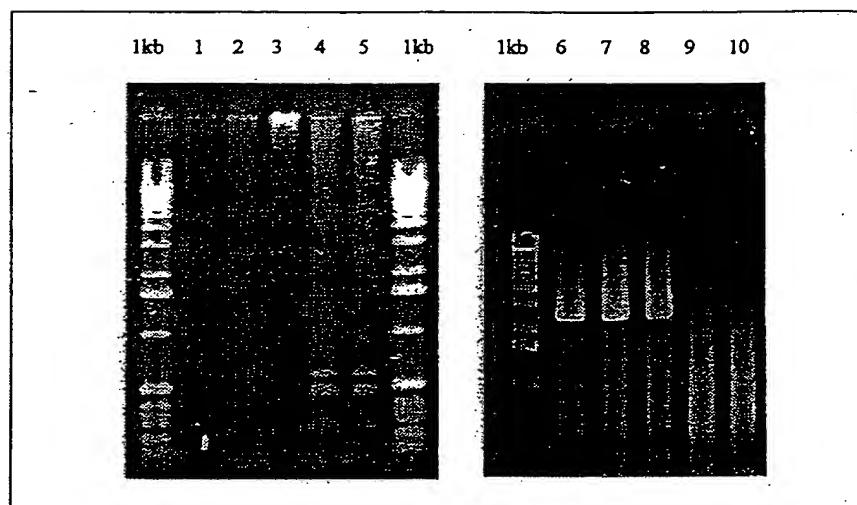


Fig. 5 : Migration of the RLR reactions and of the PCR amplifications of the reactions

<b>Tracks:</b>	1/ RLR 1	6/ PCRR LR 1
	2/ RLR 2	7/ PCRR LR 2
	3/ RLR 3	8/ PCRR LR 3
	4/ RLR 4	9/ PCRR LR 4
	5/ RLR Control	10/ PCR RLR Control

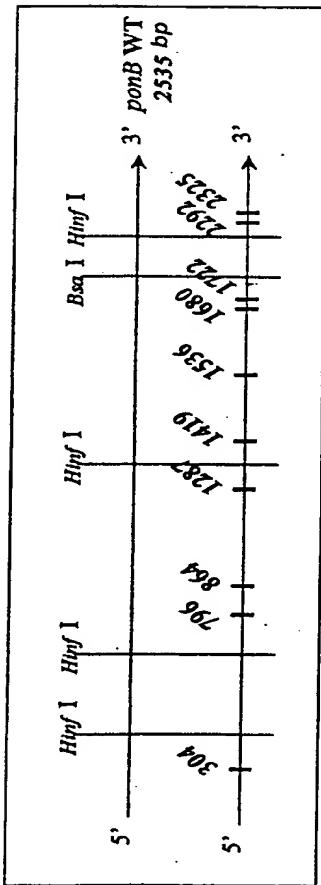


Figure 6 : Position of the mutations as compared to the restriction fragments